

植物病原糸状菌 *Rhizoctonia solani* の保持するプラスミド pRS224にコードされる特異タンパク質, RS224の解析

著者	永坂 厚
号	756
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/16921

氏 名(本籍)	^{なが} 永 ^{さか} 坂 ^{あつし} 厚
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 7 5 6 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)
学位論文題目	植物病原糸状菌 <i>Rhizoctonia solani</i> の保持するプラス ミド pRS224 にコードされる特異タンパク質, RS224 の解析
論文審査委員	(主 査) 教 授 羽 柴 輝 良 (副 査) 教 授 松 田 一 寛 教 授 熊 谷 忠

論文内容要旨

Rhizoctonia solani は多犯性の植物病原糸状菌であり、難防除土壌病原菌の1つである。本菌は菌糸同士の融合の有無によって種内類別が行われ、菌糸融合群(AG)として表示されている。AG 毎に宿主範囲が異なることから、AG 間の特性の違いに關与する因子の特定が待たれている。一方、AG1 から AG6 までに属する菌株は、各群ごとに大きさと配列の異なる、末端がヘアピンループ構造のミトコンドリア内在性線状プラスミドを保持している。これらのプラスミドには何らかのタンパク質がコードされていることから、AG 毎に異なる影響を菌体に与えている可能性が考えられる。本研究で取り扱う AG2-2 の保持するプラスミド pRS224 は塩基番号 1537-4200 に 887 アミノ酸からなるタンパク質 RS224 の ORF を持っている。pRS224 を保持する菌株 H-16 には、4.7kb, 7.4kb の 2 種類の転写産物の存在が確認されている(第 1 図)。本研究ではこの pRS224 の保持する ORF にコードされるタンパク質、RS224 の菌体に与える影響について解析した。

1. 転写産物の転写開始点

pRS224 から転写される 4.7kb, 7.4kb の 2 種類の転写産物の転写開始点を、プライマー伸長法を用いて特定した。

4.7kb の転写産物は、転写領域の 5'末端を含むと思われる pRS224 の塩基番号 1062-1755 のセンス鎖に相補的な 2 つの IRD 蛍光標識プライマーを設計し、SDS-フェノール法を用いて *R. solani* AG2-2 H-16 菌株から抽出した全 RNA と逆転写反応を行って得た。得られた逆転写反応産物と pRS224 との配列を比較した結果、4.7kb の転写産物は 1538 番目の塩基から転写が開始されていることが明らかになった(第 2 図)。7.4kb の転写産物は転写領域の 5'末端を含むと思われる塩基番号 500-1062 のアンチセンス鎖に相補的な 4 つの IRD 蛍光標識プライマーを設計し、同様に解析を行い、903 番目の塩基から転写が開始されていることが明らかになった(第 3 図)。1538 番の転写開始点の 5'上流領域には塩基番号 1512-1517 に、903 番の転写開始点の 5'上流領域には塩基番号 949-955 にプロモータのコンセンサス配列である TATA Box が存在した(第 4 図)。

7.4kb の転写産物は RS224ORF の全長である塩基番号 1537-4200 の領域が全て転写されているのに対し、4.7kb の転写産物は RS224ORF の翻訳開始コドン(1537-1539)か

ら転写が開始されていること、RS224ORF は 1810-1812 にも翻訳開始コドンとなる ATG を保持していること(第 4 図)から、塩基番号 1810-4200 の ORF が転写されていると考えられた。このことより、pRS224 からは 2 種類のタンパク質が発現している可能性が示唆され、塩基番号 1537-4200 の ORF にコードされるタンパク質(887 アミノ酸)を RS224-1 と、塩基番号 1810-4200 の ORF にコードされるタンパク質(796 アミノ酸)を RS224-2 と呼ぶことにした(第 5 図)。

2. タンパク質 RS224-1 の大腸菌内での発現

大腸菌による RS224-1 タンパク質の大量発現系の確立を行った。鋳型となる RS224-1 ORF は nested PCR により両末端に *Bam*HI リンカーを付加して増幅した(第 6 図)。得られた約 2.7kbp の増幅産物をクローニングし、シークエンスを行ない得られた増幅断片が RS224-1 ORF で有ることを確認した。得られた RS224-1 ORF を大腸菌用のタンパク質発現ベクターである pET11a の *Bam*HI サイトに組み込み、T7・Tag と RS224-1 の融合タンパク質発現ベクター、pET11a-RS224-1 ORF を作成した(第 7 図)。

作成した pET11a-RS224-1 ORF を大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlusRIL に導入し、37°C で培養後 IPTG によって誘導をかけ、T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質の発現を試みた。不溶性画分、可溶性画分の両方に分子量約 92kDa のタンパク質が発現していることを確認した(第 8 図レーン 1-4)。

抗 T7・Tag 抗体結合アガロースビーズ充填カラムを用い、T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質の精製を試みた。T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質を発現させた大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlusRIL の不溶性画分は SDS-PAGE で展開し、目的タンパク質を含むゲルを切り出し、SDS を含む Tris バッファーで溶出させた。溶出液は SDS を含まない PBS バッファーで透析した後、抗 T7・Tag 抗体結合アガロースビーズを充填したカラムに通過させ、低 pH の溶出バッファーで溶出させ、中和した。溶出バッファー中には分子量 92kDa のタンパク質が含まれていた(第 8 図レーン 5)。本タンパク質は目的の T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質であることをアミノ酸配列より確認した。

3. 抗 RS224 ウサギ抗体の作成

T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質に対する抗体を、ウサギを用いて作成した。T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質を発現させた大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlusRIL の不溶性画分より、目的タンパク質をゲル抽出したものを抗原として、ウサギ JW 系統(8 週齢, ♀)を用いて免疫操作を行った。抗血清の T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質に対し抗体価が約 2 倍になったことを確認した(第 9 図)。T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質に対し抗体価が上昇したウサギより全採血を行い、抗血清を得た。得られた抗血清は、PVDF 膜に結合した T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質を用いて、抗 T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質抗体を精製した。本抗体により *R. solani* の菌体タンパク質より RS224 相同タンパク質の検出が可能になった。

4. pRS224 を保持する H-16 菌株から RS224 相同タンパク質の検出

pRS224 を保持する *R. solani* AG2-2 H-16 菌株の全タンパク質に対して精製抗 T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、分子量約 90kDa の単一の RS224 相同タンパク質を検出した。菌糸の成長に伴う RS224 相同タンパク質の発現量の変化を調査した。PPD 培地上で 2-6 日間静置培養した H-16 菌株の菌糸を破碎し、全タンパク質を抽出し、精製抗 T7・Tag-RS224 融合タンパク質抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。RS224 相同タンパク質は、接種 2-4 日まで増加し、それ以降ほぼ一定であった(第 10 図)。また、RS224 相同タンパク質の細胞内における局在性を調査するため、破碎した菌体を遠心分離によって細胞分画し、各分画に含まれるタンパク質に対して精製抗 T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。RS224 相同タンパク質はミトコンドリア画分にもっとも多く含まれていた(第 11 図)。プラスミド pRS224 がミトコンドリア内在性であることから、RS224 相同タンパク質もミトコンドリア内で作られていることが示唆された。

これらのことから、pRS224 から分子量約 90kDa の RS224 相同タンパク質が発現しており、相同タンパク質は菌糸の成長が活発な時期(培養 2-3 日)に菌体内で増加すること、ミトコンドリア内で作られていることが判明した。

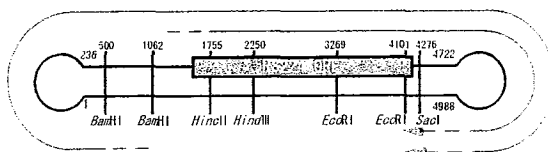
5. RS224 の機能

RS224ORF のアミノ酸配列より、本タンパク質の持つ機能について推察した。RS224 タンパク質は他の既知のタンパク質と有意な相同性を示さないが、その配列中に他の糸状菌で発見されたプラスミド内にコードされる逆転写酵素に共通してみられる 7 つの保存領域が確認された。この保存領域はレトロウイルスがコードする逆転写酵素にも共通してみられることから、RS224 が逆転写酵素活性を持つ可能性が考えられた(第 12 図)。そこで、大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlusRIL の可溶性画分に発現している T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質について、逆転写酵素の活性を測定した。本タンパク質は逆転写酵素活性は示さなかった(第 13 図)。更に *R. solani* AG2-2 H-16 菌株のミトコンドリア画分に含まれる RS224 相同タンパク質についても逆転写酵素活性を測定したが、酵素活性は検出されなかった(第 14 図)。

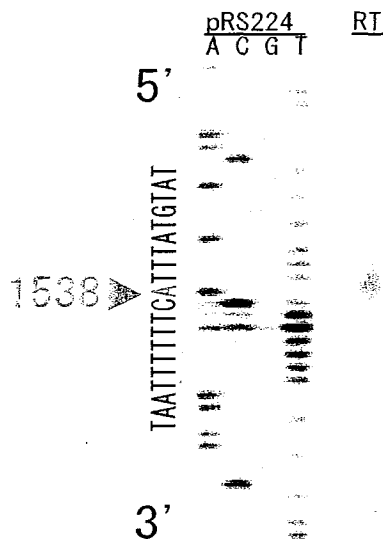
まとめ

本研究では *R. solani* AG2-2 H-16 菌株が保持するプラスミド pRS224 にコードされる RS224 タンパク質について検討した。pRS224 からは、2 種類のタンパク質 RS224-1、RS224-2 が発現している可能性が示唆された。菌体内から 90kDa の RS224 相同タンパク質が検出され、*R. solani* のプラスミドは、自らのコードする遺伝子を菌体内で発現させる機能を持っていた。RS224 相同タンパク質は、菌糸の成長に伴って含有量が増加すること、ミトコンドリア内在性であることなどの性質が明らかになったことから、本タンパク質は、ミトコンドリアの機能に関与している可能性が示唆された。しかしながらアミノ酸配列から機能を推定することは出来ず、本タンパク質の機能、並びに菌体への影響については不明であった(第 15 図)。

今後、本タンパク質についてのさらなる機能解析、並びに他の AG の保持するプラスミドの機能との比較を進めることによって、*R. solani* の保持するプラスミドの機能、並びに菌糸融合群や、宿主範囲(病原性)に関する因子との関係が明らかになるものと期待される。

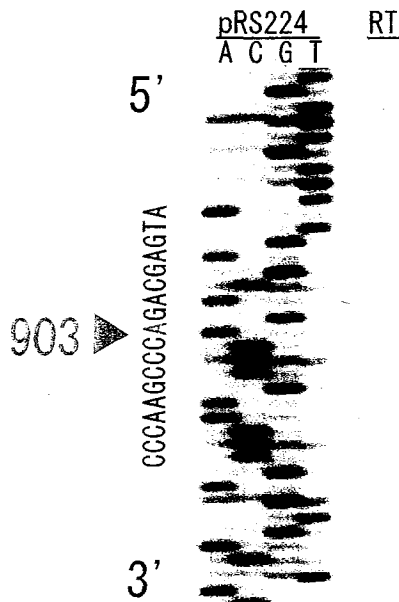


第1図 *R. solani* AG2-2 H-16菌株における pRS224相同RNAの転写様式



第2図 プライマー伸長法によるpRS224相同RNA (4.7kb)の5'末端の解析

pRS224:pRS224の塩基配列, RT:逆転写反応産物



第3図 プライマー伸長法によるpRS224相同RNA (7.4kb)の5'末端の解析

pRS224:pRS224の塩基配列, RT:逆転写反応産物

GGG TCGCAGCTA TTTAGCTGG CTGAGAAC

CGTTTGTAGT GGTGCTTCAT TGTGAGTATA TGTGTTTTT TTTCTGTGCA AGTGTGTTTT TTTCTGTTTT TTACAGTTTT ATGAGTGGT CAGTGATG

AAATTGTAA ACAACAAC AAATGCTGT C'GGCTTGG GGTCACTGAT GAGGCTCGG CCGAAGCAG TAGCTTGAA CTTTAAACAG TTTGAGTAA

TAGTTTATG GACATGGACC TGAGCAGCTA GCTGCCCGG GTTGGGGTG TGTAGTGGG ATCAATGCC TTGCTCCAT GTTGAAGGA TGGGCTTAA

AAGGCATCGG CCTTAATGT AGCAAGTCGG CTGCATCTGG GTAGAGAACT AACTTATATA GTCTTTCGGA AGAGGAAGAG TTGTAGATT GAACAAAGAG

GTTCAGAGGC ATCCCTAATT TATTAGGGTG GGTITGGCAT CCTAAGTGT ACATTGTACT CCTACATTTA AAATCGGAG TTCAATCGG ACACAGCTA

GTGAAAGCTA AGAGCTCGG ACTTCGAGTG GATCGCAGG AGAACTAAG TTCTCAAGG GGAATACCC GCTTCACTT ACTACTCTAG ATACCTCGG

TTTATGATTA AACTATTTT AACTCTCTTG GGTITGCTA GAGGCTAGA AAGTGGACT AAGTCTCTT TTAAGGAGC TAGAGCGAAT GTTGTACT

AATGCTTTG TCAGTATTA GTTTAATTC TCGCTCGG GAGGAATAA ATTAATTGA GAATTAAT TATTAGAAA ATTCTAGAA CCTTAAAGA

AAAAGGCTA GAGGATTTT TTAAGAGG GAGGAGGAT TGTGTTTT TATAAGAGC TGGATTAACA GCAATTTCTT TGGATTTG GAGGCTAGA

GGAAGTAA GAGTTTAA GAGGAGGAG GATAGGAGC ATAGGCTCG GGAATGAGG AGTGTGCTT GAGGCTGTA GAGGAGCT AATAGAGG

AGAGGAGTG TTAATLAAA GGAATLAAA GGAATLAAA AAGTGTAGT AATTTTCTT AATAATTTA ATGCTCAAT TAATTTTAT CTGCGGACA

GGGAGATTA AACTAATAA CTGAGAAAG GATTAGTAG AAGCATGCG TGTATTCCT TTAAGAGG AGTATGCTG ACTTCTTAG CBTGTAGAA

AGCGAAGAG AGTTGAAAT AGTTAGATC TAAACCGAG GTATCTAGAG TAGTAGTGT AAGGAGGAT TTGCGGTTG AGAGTTAGT TTCTCTCGG

GATCGAGCT AGTGGAGAG GTCTAGCTT GGTGCGGAT TGAAGTCTG TTTTAAAG TAGAGTACA ATGCTGACT AAGGATGCA

AAGCGAGCT AATAAATG GATGAGCTT GAGGCTCTT GTTCACTCT ACAAGTCTG CTCTGCGAA AGAGTATATA AGTTAGTCT CTACCGAGT

CGAGGAGCT TGTACATTT AAGCGAGAG GCTTTAAGC CGATCTCTG CAAGTGGGA GCAAGGAGT TGTATCGAG TACAGAGCG CAAGCGGAG

AAGTGTAGT CTGAGCTGA GTGCAATAA ACTATTACT GAACTGTTT AAGTTTCAA ACTACTGTT TCGGCGGAG CCTCATGAT GAGCGAAGC

CGAGGAGT ATTTGTTTT TTGTTAACA ATTGATATC AGTAGGAGC TGATAAAGT GTAAACAAA GAAAAAAGC AACTGAGAA GAAAAAAGC

AAGATATCT GAGATAGAG CAGCACTAGA AAGGAGTGG TGAGCGAGC AAAATAGCT GAGTCTCTG GTACGTTTA CGGTTCAT TACTGTACT

AACACTGCA GATAGAGAG GTAGCTGTA GGTGCTGTA ACCGTTTAC TGTATAGT AGTTGCGTT CGAGTCAAG GTGATTGAA AGACCGAGA

ACTAATATC CTTTGAAGC GCAAGAAAGC TTTAAAGCT TTCACTATA TATCATTTT ATGATTTTG AATCGAAGA AAAAAATAA TAAACAGAT

TTCTGGAAG ATGAGAAAC ATCAGTGGC GTAGCAATA GCGGAGGAG TACCTGAAT CATTAAGGT TGAAGTAGC TTATTATTA GAGCAGGAG

CAACAAACA GGAAGCAAG CTGAGTACG ATCTTCTGT TTTAACAAG GTAATGCTT ACTGCGGCT GTATCAGAG GATAGAGCT ACAGCGAAG

GAAATATAG CTATAGTAG TCACTGAT ACATAAATG AAAAAATTT AGCAAAATG CAGAGAAAT TATAGGAGA AGTGTGCTT GGTGATAGC

TAGATAAAT GATAGAGT TCTTGTAA TATAGAGAG AAGCTTGG TGTATAGAG GAGGTTAGG AGAGTTGAG ATGAGAGGA AGTTGAGT

GAAAGCGTG TATCTGCGA ACATTGCGA GTTAAATCT GGTCTGGAG AAGTTAGCG CCGTGTAT GCGGAGAGA TCTGAGAG ATATGAGT

AAGAGGAT TGAAGTGG TCTAGTGA GAGCAAGC GATATCTGG TTATATGAT AAGGATGAT ATCAATGGA TGAAGAGAG AGAGGAGT

GTCTAGAGC AGTATTAAG TCTTTATTC GAGATCAAA TCTCTTTTG ATGCGGCTT TATTAGTAT AGATAAAT CTATAGCGG AAGAGGAT

GAGGTTACT GTGATCTTA TAAAGTGA AAGTACTTA AGAGGATAG ATGATCTCT CAAATAGTA AATGAGTCT AGCAAGCGG AGATGATAC

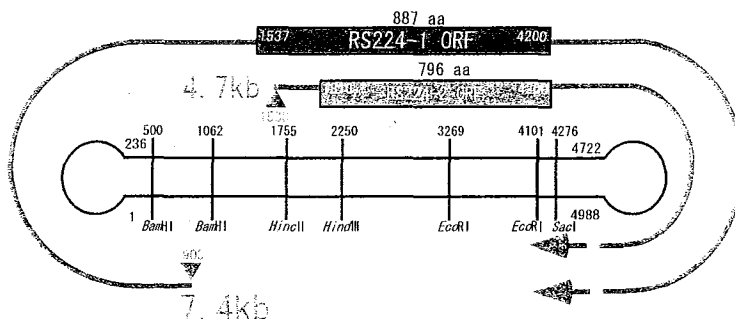
AAGTCTAT TTAGATGAT GATATTAAG AGAGTCTTA TACTTAAAG CCGCAAGAG AAGATAGAG AAGTGTAGT AGTACTCTA GGTGAGAG

TGTATAGTA AATGCTGTA ATCTCTGAG AATGAGT GTAGAGTGA AGCTT

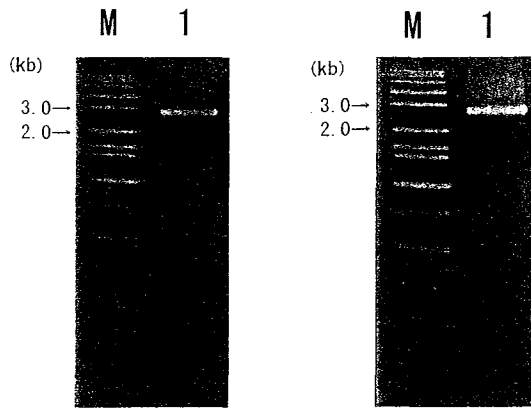
第4図 転写開始点付近のpRS224の塩基配列

塩基配列はアンチセンス鎖の塩基番号1067からセンス鎖の塩基番号2254まで表示。
赤:左ヘアピンループ部の塩基配列。青:転写開始点。紫:TATA BOX。

青:RS224 ORF領域。ATG:翻訳開始コドン

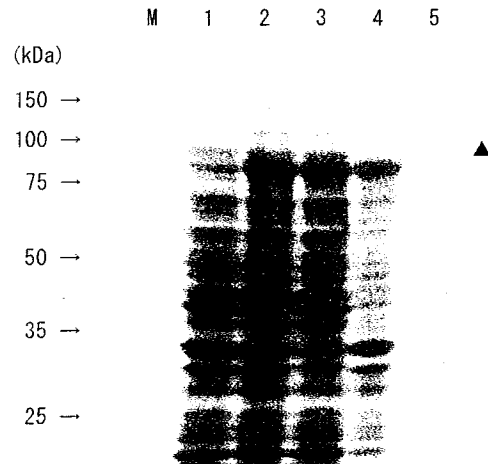


第5図 pRS224にコードされる2種類のタンパク質



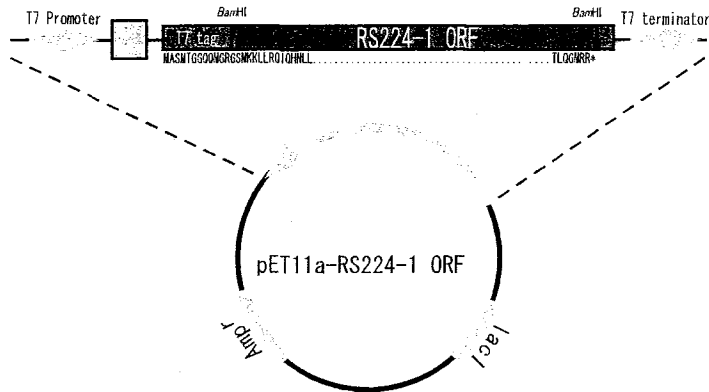
第6図 PCRによるRS224-1 ORFの増幅

左: *R. solani* AG2-2 H-16 Total DNAをテンプレートとして1st PCRを行う。プライマーとしてRS224 1st F, RS224 1st Rを用いたPCR産物を1%アガロースゲルで泳動。レーン: M: 分子量マーカー, 1: PCR産物
右: 左図で得られたPCR産物をテンプレートとして2nd PCRを行う。プライマーとして *Ban*HI-RS224orfF, *Ban*HI-RS224orfRを用いたPCR産物を1%アガロースゲルで泳動。レーン: M: 分子量マーカー, 1: PCR産物

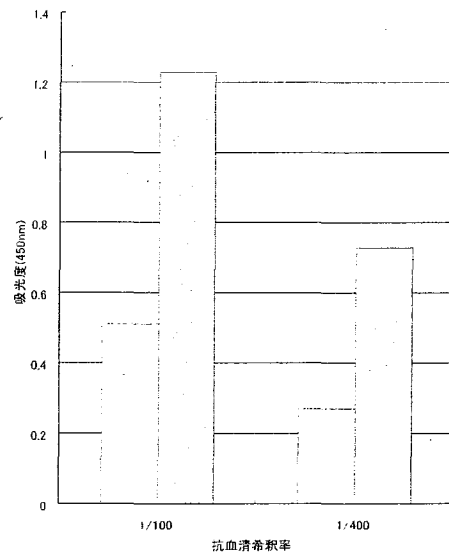


第8図 BL21 (DE3)-CodonPlus RIL による
T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質の発現

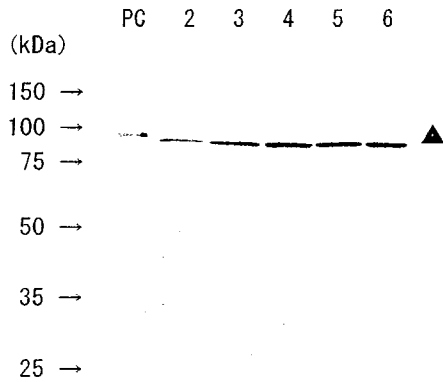
レーン: 1: BL21 (DE3)-CodonPlus-RIL 全タンパク質, 2: T7・Tag-RS224-1融合タンパク質を発現させたBL21 (DE3)-CodonPlus-RIL 全タンパク質, 3: レーン2の可溶性画分, 4: レーン2の不溶性画分, 5: 抗T7・Tag抗体結合カラムを用いて精製したT7・Tag-RS224-1融合タンパク質。▲: T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質



第7図 T7・Tag-RS224-1融合タンパク質発現ベクター
pET11a-RS224-1 ORF

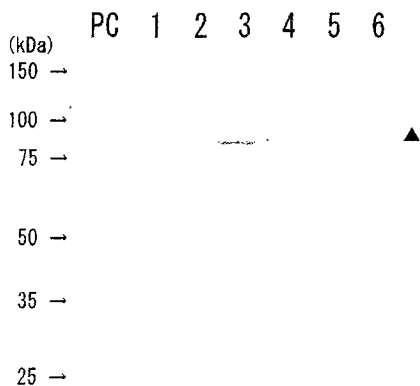


第9図 T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質を免疫したウサギの抗血清における抗体価の上昇
□: 免疫前血清 □: 5週目血清



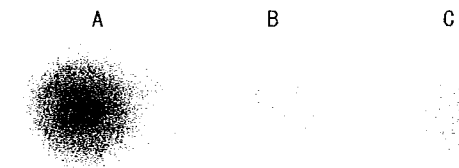
第10図 菌糸の成長とRS224相同タンパク質の発現

レーン: 番号: 培養日数, PC: T7・Tag-RS224-1融合タンパク質, ▲: RS224相同タンパク質



第13図 T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質の逆転写酵素活性

Poly(rA)・p(dT)₁₂₋₁₈ への[α-³²P]dITPの取り込みを測定
A: AMV RT, B: ネガティブコントロール, C: 37°Cで発現誘導した大腸菌可溶性画分タンパク質



第14図 H-16菌株が保持するRS224相同タンパク質の逆転写酵素活性

Poly(rA)・p(dT)₁₂₋₁₈ への[α-³²P]dITPの取り込みを測定
A: AMV RT, B: ネガティブコントロール, C: *R. solani* AG2-2 H-16菌株のミトコンドリア画分

第11図 H-16菌株の細胞画分におけるRS224相同タンパク質の検出

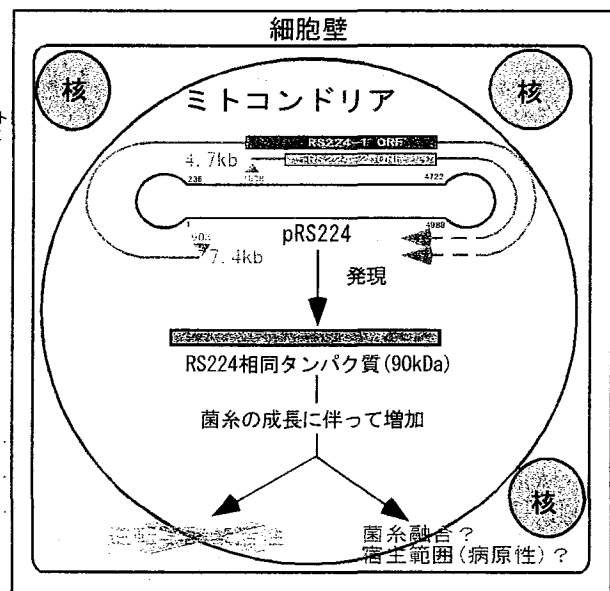
レーン: PC: T7・Tag-RS224-1融合タンパク質, 1: 細胞壁画分, 2: 核画分, 3: ミトコンドリア画分, 4: 小胞体膜を主成分とする画分, 5: リボソーム, 巨大分子を主成分とする画分, 6: 細胞質画分, ▲: RS224相同タンパク質

	Region I	Region II	Region III
pRS224	201 YIPKPGTNKVRPLGVP	241 QHGFVPRRGLT	267 ILEVDFKGFPSV
Mauric	128 YIPK-ANGKQRLGVP	168 QHAYFPKRGVFT	193 IYFDLKNFFPSV
pFOX2	142 YILK-KNGKMRPIGAP	183 QHGYMKRGAWNS	209 GYFDLKSFFNTV

	Region VI	Region V	Region VI	Region VII
pRS224	512 QFGLPQGGPLSPFLST	546 CLFYADDGFF	579 GIQISFEKS	626 KFLGLEF
Mauric	290 TNGVPQGGSTSCGLAT	318 LIMYADDGIL	343 GVQEPKAS	365 KFLGLEF
pFOX2	273 RTGVPOGLSLSPLLST	300 LIMYADDGII	330 GIEISPEKS	345 KFCGVTI

第12図 糸状菌の保持するミトコンドリア内在性プラスミドにコードされる逆転写酵素の保存領域

pRS224: pRS224にコードされる逆転写酵素
Mauric: *Neurospora crassa*の保持する環状プラスミドMaulicevilleにコードされる逆転写酵素
pFOX2: *Fusarium oxysporum*の保持するpFOX2にコードされる逆転写酵素
下線: 逆転写酵素のアミノ酸配列に共通するYxDD (Try-xxx-Asp-Asp) 配列



第15図 *R. solani* AG2-2 H-16菌株におけるpRS224にコードされるタンパク質

論文審査結果要旨

Rhizoctonia solani は多犯性の植物病原糸状菌であり、難防除土壌病原菌の1つである。本菌は菌糸同士の融合の有無によって種内類別が行われ、菌糸融合群 (AG) として表示されている。AG 毎に宿主範囲が異なることから、AG 間の特性の違いに関与する因子の特定が待たれている。一方、AG 1 から AG 6 までに属する菌株は、各群ごとに大きさと配列の異なる、末端がヘアピンループ構造のミトコンドリア内在性線状プラスミドを保持している。これらのプラスミドには何らかのタンパク質がコードされていることから、これらが菌体内で発現していた場合、AG 毎に異なる影響を菌体に与えている可能性が考えられる。本研究では、AG 2-2 の保持するプラスミド pRS224 について取り上げ、コードされるタンパク質 RS224 について解析した。

pRS224 から転写される 4.7kb, 7.4kb の 2 種類の転写産物の転写開始点をプライマー伸長法を用いて特定した。その結果、この 2 種類の転写産物には RS224ORF の異なる領域が転写されていることが明らかにになり、pRS224 からは 2 種類のタンパク質 (RS224-1, RS224-2) が発現している可能性が示唆された。次に、大腸菌において RS224-1 タンパク質を T7・Tag との融合タンパク質である T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質として発現させた。また、これを抗 T7・Tag 抗体結合カラムを用いて精製した。さらに、発現させたタンパク質を抗原としてウサギに免疫を行い、T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質抗体を作成した。更に、pRS224 を保持する *R.solani* AG 2-2 H-16 菌株における RS224 相同タンパク質の発現について調査した。抗 T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質抗体を用いたウエスタンブロットティングの結果、H-16 菌株の菌体内に分子量約 90kDa の単一の RS224 相同タンパク質を検出した。また、この RS224 相同タンパク質は細胞分画法による調査の結果ミトコンドリアに局在することを明らかにした。このことは pRS224 からの転写・翻訳過程がミトコンドリアで行われている可能性を示唆した。さらに、この RS224 相同タンパク質は菌糸の成長に伴って発現量が増加するタンパク質であることを明らかにした。また、RS224-1, -2 のアミノ酸配列より、これらのタンパク質の持つ機能について推察した。その結果、他の糸状菌で発見されたプラスミド内にコードされる逆転写酵素やレトロウイルスがコードする逆転写酵素に共通する保存領域の存在を見出した。大腸菌で発現させた T7・Tag-RS224-1 融合タンパク質と *R.solani* AG 2-2 H-16 菌株のミトコンドリア画分に含まれる RS224 相同タンパク質について逆転写酵素活性を測定した。その結果、これらのタンパク質は逆転写酵素活性を示さず、RS224-1, -2 が逆転写酵素活性を保持しない可能性が示唆された。

以上のように本研究は、*R.solani* の AG や病原性に関係すると期待されるミトコンドリア内在性プラスミドにコードされる未知のタンパク質について、その転写、翻訳過程の一部を明らかにした。また、アミノ酸配列から逆転写酵素としての特徴を持つことを明らかにし、その活性の有無を確認した。この結果は本菌の保持するプラスミドの更なる機能解析において極めて大きな貢献を果たす物と期待される。よって審査員一同は、この論文の著者に博士 (農学) の学位を授与するに値すると判断した。